




METHOD WHICH CAN BE AUTOMATED FOR DETERMINING NUCLEOTIDE CONFIGURATION

Patent number: JP62085863
Publication date: 1987-04-20
Inventor: ROBAATO JIIN MERAMEEDE
Applicant: NEW YORK MEDICAL KARETSUJI
Classification:
- **international:** C12N15/00; C12Q1/68; G01N33/50
- **european:**
Application number: JP19860168200 19860718
Priority number(s): US19850756129 19850718

Also published as:

 EP0223618 (A)
 US4863849 (A)
 EP0223618 (A)

Abstract not available for JP62085863

Abstract of correspondent: **US4863849**

This invention relates to a method for determining the nucleotide sequence of DNA and RNA molecules. The method is automatable and avoids the use of radioactive labels and gel electrophoresis. The method is also adaptable for introducing site-specific mutations in DNA and RNA molecules.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭62-85863

⑬ Int. Cl.⁴ 識別記号 庁内整理番号 ⑭ 公開 昭和62年(1987)4月20日
G 01 N 33/50 P-8305-2G
// C 12 N 15/00 7115-4B
C 12 Q 1/68 8412-4B 審査請求 未請求 発明の数 2 (全29頁)

⑮ 発明の名称 スクレオチド配列決定のためのオートメーション可能な方法

⑯ 特 願 昭61-168200

⑰ 出 願 昭61(1986)7月18日

優先権主張 ⑱ 1985年7月18日 ⑲ 米国(US) ⑳ 756129

㉑ 発 明 者 ロバート ジーン アメリカ合衆国 ニューヨーク州 10512、カーメル、デ
メラメーデ イーン ロード (番地なし)
㉒ 出 願 人 ニューヨーク メディ アメリカ合衆国 ニューヨーク州 10595、バルホーラ、
カル カレッツジ エルムウッド ホール (番地なし)
㉓ 代 理 人 弁理士 八田 幹雄 外2名

明細書の浄書(内容に変更なし)

日 月 年 日 時 分 秒

1. 発明の名称

スクレオチド配列決定のためのオート
メーション可能な方法

2. 特許請求の範囲

(1) (a) 既知の窒素含有塩基を有する活性化ヌクレ
オシド 5'-三リン酸を、鋳型依存性DNAポ
リメラーゼと、プライマーがプライマーの3'
末端で鋳型よりも少なくとも1ヌクレオチド
残基短いものであるように相補性オリゴヌ
クレオチドプライマーにハイブリットされた一
重鎖ポリヌクレオチド鋳型とからなる反応混
合物へ、該活性化ヌクレオシド 5'-三リン酸
が鋳型の非対合ヌクレオチド残基に相補性で
ある場合にプライマーの3'末端でのプライマ
ー上への活性化ヌクレオシド 5'-三リン酸前
駆体の取込みをもたらし条件下で添加し、そ
して

(b) 該ヌクレオシド 5'-三リン酸前駆体がプラ

イマー鎖中に取込まれたか否かを検知する
こととなるヌクレオチドの塩基配列を決定するた
めの方法。

(2) 活性化前駆体の取込みの検知が、

- (a) 反応混合物から、取込まれなかったヌクレ
オシド 5'-三リン酸前駆体を分離し、そして
(b) 分離された成分中における取込まれなかつ
たヌクレオシド 5'-三リン酸前駆体の存在ま
たは不存を検知する

ことにより行なわれるものである特許請求の範囲
第1項に記載の方法。

(3) 分離された取込まれなかったヌクレオシド
5'-三リン酸前駆体の存在または不在が吸収分光
学によって検知されるものである特許請求の範囲
第2項に記載の方法。

(4) 吸収波長が紫外域にあるものである特許請求
の範囲第3項に記載の方法。

(5) 分離された取込まれなかったヌクレオシド
5'-三リン酸前駆体の存在または不在が蛍光分光
学によって検知されるものである特許請求の範囲

第2項に記載の方法。

(6) 前駆体の取込みの検知が、

- (a) 反応混合物から、取込まれなかったヌクレオシド 5'-三リン酸前駆体を分離し、そして
- (b) 分離された取込まれなかったヌクレオシド 5'-三リン酸前駆体の存在または不在を電気化学的に検知する

ことにより行なわれるものである特許請求の範囲第1項に記載の方法。

(7) 活性化ヌクレオシド 5'-三リン酸が放射標識され、そして分離された取込まれなかった放射標識ヌクレオシド 5'-三リン酸の存在または不在を放射能計数により検知するものである特許請求の範囲第2項に記載の方法。

(8) 鋳型がDNAからなり、ヌクレオチドポリメラーゼがDNA依存性DNAポリメラーゼからなり、また活性化ヌクレオシド 5'-三リン酸前駆体がデオキシリボヌクレオシド 5'-三リン酸前駆体からなるものである特許請求の範囲第1項または第2項に記載の方法。

鋳型の非対合ヌクレオチド残基に相補性である場合にプライマーの3'末端でのプライマー上への活性化ヌクレオシド 5'-三リン酸の取込みをもたらし条件下で添加しそして、

- (b) 反応混合物から取込まれなかった前駆体を分離し、そしてこの分離された成分中の取込まれなかったヌクレオチドの相対量を検知することにより 5'-三リン酸の取込みを検知し、
- (c) 変異生成されるべき残基の前に位置する鋳型上のヌクレオチド残基まで、プライマーが伸長するまで上記(a) および(b) 段階を繰返し、
- (d) 鋳型と誤対合するであろう所望の変異を構成する塩基を有するヌクレオシド 5'-三リン酸の類似体を、該類似体のプライマー鎖中への取込みをもたらし条件下で添加し、
- (e) 反応混合物から取込まれなかった類似体

(9) 鋳型がDNAからなり、ヌクレオチドポリメラーゼがDNA依存性RNAポリメラーゼからなり、また活性化ヌクレオシド 5'-三リン酸前駆体がりボヌクレオシド 5'-三リン酸前駆体からなるものである特許請求の範囲第1項または第2項に記載の方法。

(10) 鋳型がRNAからなり、ヌクレオチドポリメラーゼがRNA依存性DNAポリメラーゼからなり、また活性化ヌクレオシド 5'-三リン酸前駆体がデオキシリボヌクレオシド 5'-三リン酸前駆体からなるものである特許請求の範囲第1項または第2項に記載の方法。

(11) (a) 既知の窒素含有塩基を有する活性化ヌクレオシド 5'-三リン酸を、鋳型依存性ヌクレオチドポリメラーゼと、プライマーの3'末端で鋳型よりも少なくとも1ヌクレオチド残基短いものであるプライマーにハイブリッドされた既知配列を有する一重鎖ポリヌクレオチド鋳型とからなる反応混合物へ、該活性化ヌクレオシド 5'-三リン酸前駆体が

を分離し、そしてこの分離された成分中の取込まれなかった類似体の相対量を検知することによって類似体の取込みを検知し、さらに

(f) 変異生成されたヌクレオチドの合成が完了するように、4つの塩基のすべての混合物からなる活性化ヌクレオシド 5'-三リン酸前駆体群を反応混合物に添加する

こととなるヌクレオチドの部位特異的変異生成のための方法。

(12) ヌクレオシド 5'-三リン酸の類似体がヌクレオシド (1-チオ)-三リン酸からなるものである特許請求の範囲第1項に記載の方法。

3. 発明の詳細な説明

[1. 発明の分野]

本発明は、DNAまたはRNAのいずれかの塩基配列を決定するための新規な方法に関するものである。本発明の方法は、オートメーション化可能であり、また放射性標識の使用を必要としない。この方法はまた、特異的部位でDNAまたは

RNA分子の配列を変更するために用いられることができ、これにより該分子の部位特異的変異生成を与える。

[2. 発明の背景]

DNAは、デオキシリボヌクレオチドの鎖からなる、長い糸状の巨大分子である。同様にRNAは、リボヌクレオチドの鎖から構成される。あるヌクレオチドは、1つのヌクレオシド、すなわち五炭糖に結合した窒素含有塩基、および該ヌクレオシドの五炭糖のC-5(5'として示される。)に付着した水酸基で、通常エステル化された1ないしそれ以上のリン酸基から構成される。このような化合物は、ヌクレオシド 5'-ホスフェート(ヌクレオシド 5'-リン酸)または 5'-ヌクレオチドと呼ばれる。DNAの分子においては、五炭糖は、デオキシリボースであり、一方RNAの分子においては、五炭糖はリボースである。窒素含有塩基は、アデニンもしくはグアニンのようなプリン誘導体、またはシトシン、チミン(デオキシリボヌクレオチドにおける)もしくはウラシル(リボヌ

クレオチドにおける)のようなピリミジン誘導体であり得る。従って、DNAの主要なヌクレオチドは、デオキシアデノシン 5'-三リン酸(dATP)、デオキシグアノシン 5'-三リン酸(dGTP)、デオキシチジン 5'-三リン酸(dCTP)およびデオキシチミジン 5'-三リン酸(dTTP)である。RNAの主要なヌクレオチドは、アデノシン 5'-三リン酸(ATP)、グアノシン 5'-三リン酸(GTP)、チジン 5'-三リン酸(CTP)およびウリジン 5'-三リン酸(UTP)である。

DNAまたはRNA分子のプリンおよびピリミジン塩基の配列は、該分子において含まれる遺伝子情報をコード化する。DNAまたはRNA分子の糖およびリン酸基は、巨大分子の骨格を形成する、構造的らせんをなす。詳細には、それぞれのヌクレオチドの糖部分は、以下のように隣接するヌクレオチドの糖部分にホスホジエステルブリッジによって結合されている。すなわち、1つのヌクレオチドの五炭糖の 3'-水酸基は、ホスホ

ジエステル結合によって隣接するヌクレオチドの五炭糖の 5'-水酸基に連結される。該ヌクレオチド鎖の一方の末端は 5'-水酸基を有し、また該ヌクレオチド鎖の他方の末端は、 3'-水酸基を有し、これゆえヌクレオチド鎖は極性を有する。一般に、ヌクレオチド鎖の塩基配列は、5'から3'への方向(5'→3'方向)において記載される。

デオキシリボヌクレオチド間のホスホジエステル結合の形成は、酵素DNAポリメラーゼによって触媒される。DNAポリメラーゼはDNAの鎖の合成を触媒するのに以下の成分を必要とする：鋳型鎖(template strand)(例えば二重鎖DNA分子)、プライマー(すなわち遊離 3'-水酸基を有する短いDNAあるいはRNA鎖であって、これは二重鎖の鋳型の特異的部位にハイブリッド形成される。)。DNAポリメラーゼによって触媒された、鋳型鎖の伸長は、鋳型に沿って5'→3'方向において進行する。反応は、到来ヌクレオチドの糖内方のリン原子における、鋳型の 3'-ヒドロキシル末端の求核攻撃によって発生し、ホスホジエ

ステルブリッジが形成され、そしてピロリン酸が放出される。DNAポリメラーゼは、到来ヌクレオチドの塩基が鋳型鎖におけるヌクレオチドの塩基に相補性である場合にのみ、ホスホジエステル結合の形成を触媒する。すなわち、到来ヌクレオチドは、鋳型と正しいワトソン-クリック型塩基対を形成しなければならない。これゆえDNAポリメラーゼは鋳型に指示された酵素(template-directed enzyme)、鋳型依存性酵素)である。逆転写酵素もまた鋳型依存性DNAポリメラーゼであるが、RNAをその鋳型として必要とする。その他の酵素であるRNAポリメラーゼは、DNA鋳型に相補性である活性化リボヌクレオチド前駆体の重合を触媒する。エシェリキア・コリ[E. Coli]DNAポリメラーゼIおよびT4 DNAポリメラーゼのような、いくつかのポリメラーゼはまた、非対合末端において作用する3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を有する。この3'→5'エキソヌクレアーゼ活性は、重合が続く前に誤って対合した塩基を除去する、すなわち誤って対合

した塩基を伸長する鎖の外へ修正する[edit]ことにより「プルーフリーディング([proof-reading], 校正)」機能を与える。

(2. 1. DNA配列決定):

いくつかの異なる手段が、DNAまたはRNA分子の塩基配列を決定するために現在用いられている。これらのアプローチはかなり異なっているが、現在用いられている方法のいずれもが以下の共通の要素を有している:

- (a) それぞれの分子が1つの共通の末端(5'もしくは3')を有している放射活性なポリヌクレオチドの集団を製造するための方法;
- (b) 1つの共通の末端を有するが、シングル塩基[single base]の増加における他の末端での長さにおいて異なるポリヌクレオチドの整列を、放射活性なポリヌクレオチドのこの集団から製造するための方法; および
- (c) 通常は、オートラジオグラフが作製される高解析変性ポリアクリルアミドゲルにおける電気泳動的分離による、サイズにより分子の

物は2つに分けられる。次に述べるように、一方の半分は「マイナス」システムに従って処理され、他方は「プラス」システムに従って処理される。

(a) 「マイナス」システム: ランダムな長さの放射標識されたオリゴヌクレオチド(これらは、鋳型DNAへ、なおハイブリッド形成される。)の混合物は、4つの別々の反応混合物に分けられ、3つの活性化ヌクレオチド前駆体の存在下にDNAポリメラーゼと再びインキュベートされる。すなわち、4つのヌクレオシド-5'-三リン酸の1つがそれぞれの反応混合物から除かれている。それぞれの鎖の伸長は、鋳型に沿う限りにおいて進行する。いい代えれば、それぞれの鎖は、除かれている残基の取込みの部位の前の位置においてその3'末端で終了する。例えば、-Aシステムにおいては、dATPが、反応混合物から除かれているヌクレオチドであり、そしてそれぞれの鎖は、成長する鎖中に取込まれるであろうdATP残基の前の位置において、その3'末端で終了する。それゆえ、インキュベーション期間の終了時点で、

集団を定序するための方法。配列は、オートラジオグラムにおいて得られる「バンド」ないしは「ラダー[ladder]」から推論される。特定の配列決定方法が、以下の分節において述べられる。

(2. 1. 1. プラス/マイナスDNA配列決定法)

プラス/マイナスDNA配列決定法(サンガーとコールソン[Sanger and Coulson], 1975, J. Mol. Biol. 94:441-448)は、以下のことを包含するものである。

DNAポリメラーゼは最初に、プライマーであるオリゴヌクレオチドを伸長する、および4つの活性化ヌクレオチド前駆体(その1つは ^{32}P で標識される。)の存在下に鋳型を複製するために用いられる。理想的に、合成は、非同時性でかつ可能なかぎりランダムであり、これによって異なる長さのオリゴヌクレオチドの最大数が、前駆体よりいずれも出発して、形成される。過剰な未反応ヌクレオチドは除去され、そしてDNA鎖の混合

それぞれの反応混合物は、それぞれ共通の5'末端を有するが、3'末端での長さにおいて異なるDNA分子の集団を含むであろう。それぞれの反応混合物における異なる長さの放射標識ヌクレオチドは、変性ポリアクリルアミドゲルにおける電気泳動によって、サイズに従い分画される。なお、それぞれの反応混合物は、別々のレーンにおいて分画される。DNAに沿うそれぞれの残基の相対位置は、局在され得、そしてDNAの配列は、得られたゲルのオートラジオグラフから推論される。このシステムのみでは、配列を確認するのに通常十分でないために、第二の同様なシステムである。以下に述べるプラスシステムが、これと組合せて通常用いられる。

(b) 「プラス」システム: ランダムな長さの放射標識されたオリゴヌクレオチド(これらは鋳型DNAへなおハイブリッド形成される。)の混合物が、4つの別々の反応混合物に別けられ、このそれぞれが、4つの活性化ヌクレオチド前駆体の1つのみの存在下においてDNAポリメラーゼと

再びインキュベートされる。例えば、+Aシステムにおいては、dATPのみが反応混合物中に存在する。DNA分子の集団は、それぞれ共通の5'末端を有するが、すべての鎖は、デオキサデノシン残基で終了する異なる長さを有するであろう。dATP残基の位置は、変性ポリアクリルアミドゲルにおける電気泳動によりサイズによってそれぞれの反応混合物におけるDNA鎖を分画した後、得られるオートラジオグラフにおけるバンドによって、示されるであろう。なお、それぞれの反応混合物は別々のレーンにおいて分画される。通常これらは、-Aシステムにおける相応するバンドより1残基大きなものであるオリゴヌクレオチド産物であろうが、1以上の連続的なdATP残基がある場合、-Aおよび+Aシステムにおけるバンド間の距離は、このような連続的な残基の数を示すものであろう。

このプラス/マイナス システムに関して、確かな結果を得るために、種々の基準が満足させられなければならない。例えば、すべてのDNAフ

ラグメントは同様の5'末端を有しなければならず、またDNAポリメラーゼのクレノウ[Klenow]フラグメントが、DNAポリメラーゼの5'エキソヌクレアーゼ活性を消去するために用いられなければならない。さらにまた、ヌクレオチドはサイズに従い分画されることが必須である。理想的に、すべての可能な長さのオリゴヌクレオチドは、すべての残基がプラスおよびマイナスシステムにおいて表わされるように、最初の反応混合物中に存在すべきであるが、このことを達成することは、ある産物が他のものがない場合であってもかなり高い収率で形成されるために困難なことである。これは、ポリメラーゼが異なる部位において異なる割合で作用すること、ないしはこの効果は鋳型の二次構造に部分的に関連するものであることを提唱するものであった。サンガーら[Sanger et al.] (上記)は、合成がポリメラーゼのかなり高い温度において短い時間で行なわれた場合に、最高の結果が得られることを報告しているが、頻繁にいくつかの期待された産物が欠除している。これは、

該方法の限界を構成するものであり、またなぜプラスおよびマイナスシステムの双方を使用する必要があるかの1つの理由である。与えられたヌクレオチドの連続進行は、配列決定のプラス/マイナス方法が、用いられた場合の主要な困難性を表わす。

(2. 1. 2. チェイン ターミネーター法 [dideoxy chain termination method])

サンガーら、1977年、プロシーディング オブ ザ ナショナル アカデミー オブ サイエンシズ オブ ザ ユナイテッド ステート オブ アメリカ 74:5463 [Sanger et al., 1977, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74:5463]の「ジデオキシ」鎖末端DNA配列決定法["dideoxy"chain termination DNA sequencing method]はまた、短いDNAプライマーにハイブリッド形成される、一重鎖DNA鋳型の相補性の放射標識複製を合成するDNAポリメラーゼの能力の使用を行なうものである。合成は、4つのデオキシヌク

レオシド 5'-三リン酸(dNTP)のすべて(これらの1つ、またはそれ以上が³²Pで標識される。)、ならびに4つのdNTPの1つの2',3'-ジデオキシヌクレオシド三リン酸類似体の存在下において行なわれる。4つの別々のインキュベーション混合物は、それぞれが4つのジデオキシヌクレオチド類似体の1つのみを、含んで調製される。該類似体が取込まれると、成長する鎖の3'末端はもはやDNAポリメラーゼに対する基質ではなく、これゆえに、さらに伸長されることは全く不可能である。インキュベーション期間の終了時点で、それぞれの反応混合物は、共通の5'末端を有するが、ヌクレオチド塩基特異的3'末端への長さにおいて異なるDNA分子の集団を、含んでいるであろう。DNA分子の集団のそれぞれは、次に変性され、ゲル電気泳動によってサイズに従って分画される。なおそれぞれの反応混合物は、別々のレーンにおいて分画される。ゲルのオートラジオグラフィーは、配列に推論されることを許容する。

関心のDNA配列の複数の複製を得るための一重鎖バクテリオファージM13、およびその「万能プライマー」配列の使用は、ジデオキシ鎖末端DNA配列決定法の有用性を極めて高めるものであった。しかしながら該方法は、サイズによるDNA産物の分画を絶対的に必要とし、そしてこれゆえゲル電気泳動を含むものである。

(2. 1. 3. マクサム-ギルバート[Maxam-Gilbert]法)

DNA配列決定のマクサム-ギルバート法は、化学的配列決定方法である(マクサムとギルバート, 1977年, プロシーディング オブ ザ ナショナル アカデミー オブ サイエンシズ オブ ザ ユナイテッド ステート オブ アメリカ 74:560[Maxam and Gilbert, 1977, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74:560])。1つの分離したDNAフラグメントの3'または5'末端のいずれかを放射性標識した後、該DNAのアリコート(部分標本, [aliquot])が、4つの別々の反応混合物中に移され、該反応混合物のそれぞれは、

オートメーション化されないことである。オートメーションでの現在の試みは、オートラジオグラフにおけるバントないしはラダーの光学密度を「読む」ための濃度計の使用を含むものである。これらの技術は、ゲルレーンが直線であることを要求し、またさらに操作者による注意深いモニターリングを必要とする。

(2. 2. 部位特異的変異生成)

DNAを変異生成するために現在用いられている方法は、アルキル化剤、ミトマイシンC、電離放射線もしくは紫外放射線のような変異誘発要因での処理を含む生体内[in vivo]技術、または、重亜硫酸塩で誘発された欠失ループ変異生成のような試験管内(in vitro)技術を含むものである。しかしながら、これらの方法は、非特異的様式において多重塩基置換を得るのに適当である。

DNAにおける選択的部位で特異的塩基置換をもたらすために、いくつかの方法が進展してきている(用いられる方法の簡単な概観に関しては、ザコーら, 1984年, ヌクレイック アシズ

DNAを1つの塩基特異的様式において部分分解する。DNA配列は、得られるオートラジオグラムにおいて出現するラダー[ladder]から推論される。

(2. 1. 4. RNA配列決定)

主要なRNA配列分析術は、5'および3'末端標識処方を用いるものである。(イングランドとオーレンバック, 1978年, ネイチャー 275:561[England and Uhlenbeck, 1978, Nature 275:561])。放射性標識に続き、RNAは、塩基特異的RNアーゼ([RNase], リボヌクレアーゼ)または化学品を用いてフラグメント化される。DNA配列決定法と同様に、オリゴリボヌクレオチドの集団のそれぞれは、変性ポリアクリルアミドゲルにおける高解析電気泳動によりサイズによって分画される。配列は次に該ゲルに相応するオートラジオグラムから推論される。

(2. 1. 5. 配列決定のオートメーション)

上記に述べた配列決定法に対するいくつかの主要な障害は、烈しい労働、時間浪費および容易に

リサーチ 12(6):6615~6628およびアバルズアラ, 1984年, プロシーディング オブ ザ ナショナル アカデミー オブ サイエンシズ 81:2030~2034[Zakour et al., 1984, Nucleic Acids Research 12(6):6615-6628 and Abarzua et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. 81:2030-2034]を参照のこと。)。1つの方法は、ウィルスのDNA鋳型または組換え型DNA中へ、ヌクレオチド配列内に予め選択された変化をコード化する合成オリゴヌクレオチドを挿入することを含むものである。この方法は、有効でありかつ塩基置換変異の任意のタイプを製造できるものであるが、導入されるそれぞれ異なる変異は、該変異をコード化し、かつウィルスもしくは組換えDNAにおいて生成されるべき付着端に対して相補性である非反復[unique]オリゴヌクレオチドの合成を必要とする。

第2の方法(ショートルら, 1980年, プロシーディング オブ ザ ナショナル アカデミー オブ サイエンシズ オブ ザ ユナイ

テッド ステート オブ アメリカ 77: 5375~5379 [Shortle et al., 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:5375-5379])は、DNA分子中に微小な一重鎖ギャップを導入し、その後に対合DNA合成[mis-repair DNA synthesis]、すなわち該ギャップにおける非相補性ヌクレオチドの誤った取込み[mis-incorporation]を伴うことを含むものである。ギャップ中への α -チオールヌクレオチドの取込みは、非相補性ヌクレオチドの切断を最小化する。リン上の酸素の代わりに硫黄原子を含むデオキシリボヌクレオシド(1-チオ)-三リン酸類似体が、鋳型DNAに相補性であるDNA鎖の合成に関する基質として用いられた場合、該類似体は、相応する非修飾ヌクレオシド三リン酸のものと同様な割合で、チオモノホスフェートとして取込まれる。しかしながら該ホスフォロチエートは、エシェリキア・コリDNAポリメラーゼIあるいはT4 DNAポリメラーゼの3'→5'エキソヌクレアーゼ活性によって加水分解されず、これゆえ誤対合した塩基は、

修正されない。アバルズアら[Abarzua et al.] (1974; Proc. Natl. Acad. Sci. 81:2030-2034)は、ウィルスの一重鎖環状DNAを、エシェリキア・コリエキソヌクレアーゼⅢで順次消化された3'-ヒドロキシル末端を有する線状二重鎖DNAの混合物と、種々のハイブリッド分子に存在する、得られる、新たに生成する3'-ヒドロキシル末端が関心の領域におよぶ[span]条件下で、アニーリングすることによって生成されたギャップ化環状DNAを用いる、この技術の修正を報告している。塩基変更は、ミスマッチの[mis-matched] 2-チオデオキシリボヌクレオシド三リン酸類似体の取込みによって誘発され、DNA修復合成に続く。

用いられた第3の方法は、あるDNAポリメラーゼの不義[infidelity]に基づくものであり、シングルな[single]非相補性デオキシヌクレオシド三リン酸の存在下における非ブルーフリーデングDNAポリメラーゼによるプライマーの伸長を含み、この後、合成は、4つのデオキシヌクレオチド基質のすべての存在下において、かなり精密

なDNAポリメラーゼにより完了される。この方法の修正において、ザコーら[Zakour et al.] (1984年、ヌクレック アシス リサーチ 12(16):6615~6628 [1984, Nucleic Acids Research 12(16):6615-6628])は、 ϕ X174鋳型上の予め選択された2つの異なる位置に直接隣接した1つの位置へ、プライマー末端を伸長するために、T4 DNAポリメラーゼを用いた。次に、ニワトリ骨髄芽球腫ウィルス由来のエラー傾向性([error-prone], 誤りがちな) DNAポリメラーゼが、指定され位置に高い効率でシングルな非相補性ヌクレオチドを挿入するために用いられた。

[3. 発明の概要]

本発明は、放射活性またはゲル電気泳動法を必要としない、DNAまたはRNAを配列決定するための新規なオートメーション可能な方法を示すものである。この方法はまた、任意のDNAまたはRNA分子の部位特異的変異生成を行なうために用いられ得る。

本発明の配列決定法は、既知の窒素含有塩基を有する1つの活性化ヌクレオチド前駆体(ヌクレオシド 5'-三リン酸を、配列決定されるべき1つのプライマー起動された[primed]一重鎖ヌクレオチド鋳型と1つの鋳型依存性ポリメラーゼ([template-directed enzyme], 鋳型に指示されたポリメラーゼ)からなる反応混合物中へ添加することを含むものである。反応条件は、プライマーの3'末端から1ヌクレオチド残基向こうに位置した部位で一重鎖鋳型に相補性である場合のみ、ヌクレオチド前駆体の取込みが許されるように調整される。反応が起こるのに十分な時間が経過した後、反応混合物は、取込まれなかった前駆体が除去され、一方プライマー起動された鋳型およびポリメラーゼは反応混合物中に保たれるように、洗浄される。洗浄液ないし流出液は、前駆体の取込みに関して検定される。流出液中の取込まれなかった前駆体の検知のために用いられ得る方法は、分光法、放射性標識および計数、電気化学的方法ならびに伝導率法が含まれるが、これらに限定さ

れるものではない。反応混合物中に添加された流出液中のヌクレオチド前駆体のすべての検知は、添加された前駆体が、成長する鎖中に取込まれなかったこと、およびそれゆえにヌクレオチド配列の一部でないことを示すものである。しかしながら、添加されたものよりも少ないヌクレオチド前駆体が流出液中に検知された場合には、これは、添加された前駆体が成長する鎖中に取込まれたこと、およびそれゆえに、該配列の次のヌクレオチドであることを示すものである。

本発明の配列決定法は、容易にオートメーション化される。例えば、反応室は、反応室へ供給する5つの貯蔵器（それぞれのヌクレオチド前駆体ためのものおよび1つの洗浄緩衝液のためのもの）に付着され得る。反応容器はまた、検定のために用いられる検知装置、例えば分光測光器、シンチレーションカウンター、ガイガー・ミュラー・カウンター、伝導率ないしは電気化学的セルなど、中に流出液を供給する出口をまた有すべきである。理想的に、検定装置および、反応室の入口および

出口を調整するバルブは、反応混合物に添加されるべき特定のヌクレオチド前駆体を選択すること、流出液の該装置の読みを記録すること、および成長する鎖中にどのヌクレオチドが取込まれたかを決定し、そして記録し、これによりヌクレオチド配列の印刷出力を最終的に与えることをプログラムされたコンピューターによって制御され得る。

本発明の配列決定法は、既存の方法にまさるいくつかの利点を有している：

- (a) 放射性標識が必要とされない（しかしながら、これらを用いることは可能である）；
- (b) サイズによるポリヌクレオチドの分画が必要とされない；
- (c) ゲル電気泳動が必要とされず、これゆえ、配列決定ゲルにおけるバンドないしラダーを読むことにより推論することを、配列が必要としない；および
- (d) 配列情報は、反応進行時に得られ、これゆえ配列決定の間にふり分けられることを、結果に許容すること。

本発明の他の実施態様において、配列決定法の変更は、配列内における特定のヌクレオチド部位で、DNAまたはRNAを変容するないしは変異生成するために用いられ得る。この実施態様において、部位特異的変異生成は次のようにして達成される。鋳型鎖に相補性のヌクレオチド鎖の単段階合成が、鋳型鎖が既知のヌクレオチド配列であることを除いて、DNA配列決定に関して上記に述べたようにして行なわれる。鋳型のヌクレオチド配列が既知であるゆえ、一段一段添加されるヌクレオチド前駆体の順序は既知である。合成は、変えられるべき残基の前のヌクレオチド残基で停止される。反応混合物へ添加される次のヌクレオチド前駆体は、反応室における反応条件下においてポリメラーゼによって修正され得ないものであって、このヌクレオチド塩基は配列において望まれる変異である。該ヌクレオチドは、誤対合される（すなわち、塩基は、その残基において鋳型鎖に相補性でない。）が、該ヌクレオチドは、成長する鎖中に取込まれ、そして鋳型依存性ポリメ

ラーゼによって修正されないであろう。望まれる部位特異的変異のそれぞれが行なわれた後に、DNAまたはRNAの残りの部分の合成は段階的様式における進行を必要としないゆえ、4つの活性化ヌクレオチド前駆体のすべてが反応混合物に添加され、伸長が完了する。

本発明のこの実施態様において用いられる反応室および貯蔵器は、1つの余分な貯蔵器が必要とされる以外は、上記のDNA配列決定に関して述べたものと同様のものである。本発明の部位特異的変異生成法は、オートメーション可能であり、またコンピューターによって制御され得るものである。この場合において、コンピューターは、固有の順序において既知の配列のそれぞれのヌクレオチドを添加すること、それぞれのヌクレオチドが取込まれたことを確認するために流出液の装置の読みを記録すること、ミスマッチの類似体を次に添加すること、ならびに最後に、反応混合物中へ4つのヌクレオチドのすべてを添加することをプログラムされている。

〔4. 発明の詳述〕

本発明は、オートメーション可能であり、かつ放射活性またはゲル電気泳動を必要としない、DNAまたはRNAを配列決定するための新たな方法を示すものである。加えて、本発明はDNAまたはRNA配列の部位特異的変異生成のための方法を含むものである。

(4. 1. 配列決定)

本発明の配列決定法は次のことを含むものである。配列決定されるべき一重鎖DNAまたはRNA分子は、特異的部位において、短いオリゴヌクレオチドプライマーで起動[prime]される。プライマー起動された鋳型および鋳型依存性ポリメラーゼは、未反応のヌクレオチド前駆体の、プライマー起動された鋳型および鋳型依存性ポリメラーゼからの分離を許容する反応室中へ入れられる。鋳型が一重鎖DNA分子である場合、DNA依存性DNAポリメラーゼまたはDNA依存性RNAポリメラーゼが用いられ得る。鋳型が一重鎖RNA分子である場合、逆転写酵素(すなわち、

RNA依存性DNAポリメラーゼ)が用いられ得る。

一度に1つずつの、特定の活性化ヌクレオチド前駆体が反応室に添加され、そして反応することが許される。添加されるヌクレオチドは、反応混合物中に用いられた鋳型およびポリメラーゼの性質に依存してデオキシリボヌクレオチドカリボヌクレオチドのいずれかであり得る。例えば、鋳型が一重鎖DNA分子である場合、用いられるポリメラーゼはDNA依存性DNAポリメラーゼであり得、この場合においては添加されるヌクレオチドはデオキシリボヌクレオチドであるべきである。二重鎖DNAが用いられる場合、ポリメラーゼはDNA依存性RNAポリメラーゼであり得、この場合においては、添加されるヌクレオチドはリボヌクレオチドであるべきである。同様に、鋳型が一重鎖RNA分子である場合、用いられるポリメラーゼは逆転写酵素、すなわちRNA依存性DNAポリメラーゼであり、この場合においては、添加されるヌクレオチドは、デオキシリボヌクレ

オチドでなければならない。しかしながら、いずれの場合においても、一度には1つのタイプのヌクレオチドのみが添加される。例えば、dATP、dTTP、dGTPあるいはdCTPのいずれかが反応に添加されるが、これらのデオキシリボヌクレオチドの混合物は添加されない。同様に、ATP、UTP、GTPあるいはCTPのいずれかが反応に添加されるが、これらのリボヌクレオチドの混合物は添加されない。

添加されたヌクレオチド前駆体の塩基が鋳型に相補性である場合、すなわち、該ヌクレオチド前駆体が、プライマー鎖の3'末端から1ヌクレオチド残基向こうに位置する部位で鋳型とワトソン-クリック型塩基対を形成し得る場合、該ヌクレオチド前駆体は、成長する鎖中へ取込まれるであろう。ヌクレオチド前駆体の塩基が、プライマー鎖の3'末端から1ヌクレオチド残基向こうに位置する部位で鋳型に相補性でない場合、該ヌクレオチド前駆体は、成長する鎖中へ取込まれないであろう。ポリメラーゼ反応が生起するのに十分な時間

がもたらされた後、反応室は、プライマー起動された鋳型から未反応のヌクレオチド前駆体を分離するために「洗浄」される。次に洗浄液ないし流出液は、流出液におけるヌクレオチド前駆体の量を測定するために検定される。流出液中の取込まれなかった前駆体を検知するために用いられ得る方法は、吸収もしくは蛍光分光のような分光学的方法、放射性標識および計数(ヌクレオチド前駆体が放射標識される場合)、ならびに電気化学的もしくは伝導率法を含むものであるが、これらに限定されるものではない。

以上に述べたプロセスは、次のようにしてオートメーション化され得る。反応室は、反応室中へ供給する5つの貯蔵室(その1つは、洗浄用緩衝液を含み、また他の4つはそれぞれ1つの特定のヌクレオチド前駆体を含む。)に接続され得る。反応室はまた、1つの出口バルブを有すべきであり、これによって、1つの特定のヌクレオチド前駆体の添加および適切な反応時間の経過の後に、流出液が該出口バルブを通して、検定において用

いられる検知装置のフローセル〔flow-cell〕中に移動するように反応室が洗浄され得るものとなる。本発明のこの実施態様の種々の構成要素が第1図において図式的に説明される。貯蔵器および検出器は、どのヌクレオチド塩基が反応室に添加されたかを、また得られた流出液の検出器の読みを記録するコンピューターに接続され得る。理想的に、該コンピューターは、どのヌクレオチド前駆体を次に反応室中へ供給すべきか選択すること、および取込まれたヌクレオチドを記録し、これにより、配列の印刷出力を最終的に与えることをプログラムされることができる。

(4. 2. 部位特異的変異生成)

本発明の第2の実施態様において、配列決定法の変更に、任意のヌクレオチド配列の部位特異的変異生成の基礎として用いられ得る。本発明のこの様式によると、特異的部位で変異生成されるべき既知配列を有する一重鎖DNAまたはRNAは、短いオリゴヌクレオチドプライマーで起動される。このプライマー起動された鋳型および鋳型依存性

ポリメラーゼは、該プライマー起動された鋳型およびポリメラーゼからの未反応ヌクレオチド前駆体の分離を許す反応室に入れられる。鋳型が一重鎖DNA分子であると、DNA依存性DNAポリメラーゼまたはDNA依存性RNAポリメラーゼが用いられ得、また鋳型が一重鎖RNA分子であると、逆転写酵素（すなわち、RNA依存性DNAポリメラーゼ）が用いられ得る。

既知配列のそれぞれの活性化ヌクレオチド前駆体が、反応室へ添加され反応がなされる。添加されるヌクレオチドは、反応混合物中に用いられた鋳型およびポリメラーゼの性質に依存して、デオキシリボヌクレオチドあるいはリボヌクレオチドのいずれかであり得る。例えば、鋳型が一重鎖DNA分子である場合、用いられるポリメラーゼは、DNA依存性DNAポリメラーゼであり得、この場合、添加されるヌクレオチドはデオキシリボヌクレオチドであるべきである。同様に、鋳型が一重鎖RNA分子である場合、用いられるポリメラーゼは逆転写酵素、すなわちRNA依存性

DNAポリメラーゼであるが、この場合において添加されるヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチドでなければならない。あるいはまた、特殊機能RNAポリメラーゼが有用であるプロモーター（すなわち、T7プロモーターおよびポリメラーゼ）を含む二重鎖DNA鋳型が用いられた場合、添加されるヌクレオチドは、リボヌクレオチドであるべきである。本発明の一実施態様においては、一度には一つのタイプのヌクレオチドのみが添加される。例えば、dATP、dTTP、dGTPあるいはdCTPのいずれかが、反応に添加されるが、これらのデオキシリボヌクレオチドの混合物は添加されない。同様に、ATP、UTP、GTPあるいはCTPのいずれかが、反応に添加されるが、これらのリボヌクレオチドの混合物は添加されない。この方法の第2の実施態様においては、一度に3つまでのヌクレオチドが、合成を迅速化するために添加され得る。このアプローチは、鋳型の配列が既知であるゆえに容易である。

ポリメラーゼ反応が生起するのに十分な時間がもたらされた後、反応容器は、プライマー起動された鋳型から未反応のヌクレオチド前駆体を分離するために、「洗浄」される。次に洗浄液ないし流出液は、ヌクレオチドが、実際に、成長する鎖中へ取込まれたことを確証するために、流出液中のヌクレオチド前駆体の存在または不在を測定するために検定され得る。流出液中の取込まれなかった前駆体を検出するために用いられ得る方法には、吸光または蛍光分光のような分光学的方法、放射性標識および計数（ヌクレオチド前駆体が放射性標識されることを与える）、および電気化学的または伝導率方法が含まれるが、これらに限定されるものではない。

段階的添加およびそれぞれのヌクレオチドのもしくは、3つまでのヌクレオチドのグループの反応は続けられ、そして最後に、変異生成されるべき残基の前にあるヌクレオチド位置で停止される。反応混合物に添加される次のヌクレオチドは、反応室における条件下において、該ポリメラーゼに

より伸長する鎖から修正され得ないヌクレオチドである。例えば、該ヌクレオチドは、該ポリメラーゼにより修正され得ない類似体である。この類似体塩基は、配列において望まれる変異である。該類似体は、類似体塩基が鋳型におけるヌクレオチド残基とワトソン-クリック型塩基対を、形成しないものではあるが、変異生成されるために成長する鎖中に取込まれ、そしてこの誤対合した類似体は、成長する鎖から修正されないであろう。ポリメラーゼ反応が生起するのに十分な時間がもたらされた後、反応室は洗浄され、そして流出液が、類似体の取込みを確認するために検定される。所望の部位特異的変異生成が達成された後は、DNAまたはRNA分子の残りの部分の合成は段階的様式において進行する必要がなく、それゆえ、伸長を完了するために、4つの非修飾ヌクレオチド前駆体のすべてが反応混合物に添加される。本発明の実施態様の一例が第3図に描かれる。

本発明において用いられ得るヌクレオチド類似体には、リン上の1つの酸素原子の代わりに1つ

の硫黄原子を含むデオキシリボヌクレオシド(1-チオ)-三リン酸が包含される。これらの類似体は、相応する非修飾ヌクレオシド三リン酸のものと同様の割合でチオモノホスフェートとして取込まれる。しかしながら該ホスフォロチエート結合は、エシェリキア・コリDNAポリメラーゼIもしくはT4 DNAポリメラーゼの3'→5'エキソヌクレアーゼによって加水分解されず、それゆえ、誤対合された塩基としての類似体の取込みは、修正され得ない。他の類似体も、本発明のこの実施態様の実施において使用され得る。

上述したこのプロセスは、以下のようにしてオートメーション化され得る。反応室は、該反応室中へ供給する5つの貯蔵器(その1つは洗浄用緩衝液を含んでおり、また、他の4つのそれぞれは1つの特定のヌクレオチド前駆体を含む。)に接続されることができる。さらに、反応室は、それぞれの類似体のための1つの貯蔵器に接続されるべきである。反応室はまた、出口バルブを有しており、これによって、特定のヌクレオチド前駆

体の添加および適切な反応時間の経過の後、流出液が、検定において使用される検出装置のフローセル中へ、該出口バルブを通して移動するように該反応室が洗浄され得るものとなる。貯蔵器および検出装置は、段階的様式において添加されるヌクレオチドの選択を制御し、反応室へ添加されたそれぞれのヌクレオチド塩基の成功した取込みを記録し、また得られた流出液の検定の読みを記録するコンピューターに接続されることができる。理想的に、所望の部位特異的変異ないし変異群を有する既知のヌクレオチド配列は、簡単にコンピューター中に供給されることができ、これゆえプロセスを容易とする。

以下の分節は、本発明をさらに詳細に述べるものである。

(4. 3. 反応室および構成要素)

配列決定されるべきDNAまたはRNAは、本発明において利用されるポリメラーゼ反応における鋳型として与えられ、それゆえ、配列決定されるべき分子は一重鎖であるべきである。しかしな

がら鋳型は線状あるいは環状であり得る。これゆえ、任意の一重鎖DNAまたはRNA分子が本発明の方法に従って配列決定され得る。

本発明の実施において用いられるプライマー、ポリメラーゼおよび活性化ヌクレオチド前駆体の選択は、配列決定される鋳型の性質に依存する。例えば配列決定される鋳型がDNAである場合、用いられるプライマーは、DNA、RNAまたは双方の混合物であり得る。用いられるポリメラーゼはDNA依存性ポリメラーゼであるべきである。DNA依存性DNAポリメラーゼが用いられる場合、デオキシリボヌクレオチド前駆体が反応において用いられるであろう。また、DNA依存性RNAポリメラーゼは、反応において用いられるためのリボヌクレオチド前駆体を必要とする。しかしながら、配列決定されるべき鎖がRNAである場合、用いられるポリメラーゼはRNA依存性DNAポリメラーゼであるべきで、この場合においてはデオキシリボヌクレオチド前駆体が反応において用いられるであろう。

本発明のさらに別の実施態様においては、鋳型はプロモーターをコード化する染色体のような二重鎖DNA分子であり得る。本発明のこの様式によると、ポリメラーゼは、プロモーターを識別し、またmRNAの転写を開始するものであるべきである。それゆえ、用いられるヌクレオチドはリボヌクレオチドである。

いずれの場合においても、用いられるポリメラーゼは、高いレベルの正確さを有すべきである。すなわち、ポリメラーゼは、反応の忠実性の高いレベルを保証するために重合の前に正しい塩基対を要求すべきである。エシェリキア・コリDNAポリメラーゼⅠのようないくつかのポリメラーゼは、5'→3'エキソヌクレアーゼ活性を有するものである。本発明の1つの様式によると、5'→3'エキソヌクレアーゼにおいて低いポリメラーゼが好まれる。5'→3'エキソヌクレアーゼ活性において低いポリメラーゼの一例は、エシェリキア・コリDNAポリメラーゼⅠのクレノウフラグメントである。本発明の実施において用いられ得るその他

のポリメラーゼには、AMV逆転写酵素、エシェリキア・コリRNAポリメラーゼおよび小麦胚RNAポリメラーゼⅡが含まれるが、これらに限定されるものではない。

反応の容量は変更できるものであるが、本発明の好ましい実施態様においては、容量は1ミリリットル以下とすべきである。

反応容器は、未反応ヌクレオチド前駆体がポリメラーゼおよび反応生成物から分離されるように設計されるべきである。理想的に、反応容器は、4つのヌクレオチド前駆体の、それぞれおよび、1ないしそれ以上の洗浄用緩衝液が反応室中に供給され、該反応室は、洗浄液ないし流出液中のヌクレオチドを検定するために用いられ得る装置のフローセル中へ供給される出口を有して提供されるように設計される。出口は、反応時間の間は閉じられているが、反応の終了時点で開かれて、洗浄用緩衝液が反応室中に供給された場合に、流出液の排除をもたらす。

あるいはまた、反応容器は、連続フローシステ

ムの一部であり得る。この実施態様においては、流速は、反応容器の上流に注入されるヌクレオチド前駆体が、検出器上へ通過する前に、ポリメラーゼおよびヌクレオチド鋳型と反応する（これが配列における次の塩基である場合）のに十分な時間反応容器中にあるように調整される。

反応が液体緩衝液において実行される場合は、出口バルブに閥押された適当な孔径を有する膜が、未反応ヌクレオチド前駆体が流出液と共に通過することを許容する一方、反応生成物およびポリメラーゼを保持するように用いられ得る。この実施態様において、選択される孔径は、未反応ヌクレオチド前駆体の通過をなさせるのに充分であるが、プライマー起動された鋳型またはポリメラーゼを通過させない大きさとしてされるべきである。

他の実施態様において、ポリメラーゼまたはプライマー起動された鋳型は、不溶性の不活性支持体に固定化され得、これゆえ重合反応は、不活性支持体の表面で生起する。プライマー起動された鋳型が固定化された場合、出口バルブに閥押され

たフリット[frit]の孔径は、付着したDNAおよびプライマーを有する支持体の通過を阻止するのに十分に小さいものであることのみを必要とする。出口バルブより下にポリメラーゼを保持するために適切なサイズの分子トラップ[molecular trap]がある。このトラップを通しての流れの逆行によって、ポリメラーゼは、試みられる次のヌクレオチド前駆体と共に反応器を逆通過する。

さらに別の実施態様において、反応容器は、反応混合物におけるそれぞれの成分の移動を特異的に遅延する物質を充填されたカラムを含み得る。

多孔質膜は、列挙としては少ないが、透析膜材料、ニトロセルロースまたは酢酸セルロースのような任意の不活性な固形材料から構成され得る。

(4. 4. 反応混合物に添加されるヌクレオチド前駆体の選択)

本発明の重合反応は、実質的にプライマー末端群のすべてが、同じ位置に伸長されるように同時に進行されるべきである。反応のそれぞれの段階が完了へ進行したことを確認するため、および

得られたバックグラウンド、ないしはノイズの読みを最小化するために、種々の予防措置およびアプローチが取られ得る。

(4. 4. 1. 配列決定)

DNAを配列決定するための方法の好ましい実施態様において、ヌクレオチド前駆体の既知過剰が反応室に添加され、反応することをなされ、そして次に検出器を流れすぎた。取込まれた連続する塩基の数は、流出液中に検知されるヌクレオチドの相対量によって決定される。例えばdATPの4当量(反応室中のDNAのモル量に関して)が添加され、そして流出液信号の総和がdATPの量として期待されたものの50%であった場合、2つの連続する「A」ヌクレオチドが取込まれたことが推断され得る。この技術は、配列における繰返したヌクレオチドを示すことおよび反応時間を短縮することを与える。

DNAを配列決定するための方法の好ましい実施態様において、「誤り」いいかえれば同時的に伸長されないプライマー鎖は、流出液のバックグ

と決定された場合、配列試技において添加されるべきヌクレオチド前駆体は、dTTPである。従って、いくつかのプライマー鎖が今だ5番目のヌクレオチド「T」まで伸長していない。それゆえこれらは、反応混合物中の残りのプライマー鎖より2ヌクレオチド残基短い場合、dTTPの添加は、この短い方のプライマーを、これらが、母集団において主要なプライマー分子より常に1ヌクレオチドだけ短いものであるよう屈服させるであろう。結果として、「誤り」は、必要な場合、すなわちバックグラウンドないしノイズが非常に高い場合に、消去されるように屈服させられる。誤りは、次にdATPの添加を繰返すことによって、上記の例において正されることができる。

本発明のDNAを配列決定するための方法の代換的な実施態様においては、ヌクレオチド前駆体のそれぞれの取込みの後、同じ前駆体の追加的な量が、すべてのプライマー末端が同じ位置に延長されたことを確認するために添加される。この手順は、完全な配列が得られるまで繰返される。

ラウンド吸収を最小化するように、悪化する信号対ノイズ比ゆえに必要と思われた場合、矯正のためのヌクレオチド前駆体の、それぞれの添加で屈服させられる。これは、任意の一段階に関して反応混合物へ添加される適切なヌクレオチドの特有な選択によって達成される。一実施態様において、誤りを屈服させるために、プライマー鎖中に首尾よく取込まれた最後から二番目のヌクレオチドが、反応混合物中に添加される次のヌクレオチド前駆体であるべきである。洗浄し、さらに流出液を検定した後、該ヌクレオチド前駆体が伸長したプライマー鎖中に取り込まれなかったことを測定した場合、任意の順序で、他の3つのヌクレオチドのそれぞれが、一度に一つずつ試され得る。信号対ノイズ比が非常に高いものとなった場合、蓄積したノイズは、伸長する鎖中に首尾よく取込まれた最後のヌクレオチドの添加によって矯正される。このプロセスは、完全な配列が得られるまで必要であれば繰返される。例えば、本発明の方法を用いて得られた配列が、「ATGCTA」である

(4. 4. 2. 部位特異的変異生成)

DNAまたはRNA鋳型の配列が既知であるゆえ、ヌクレオチド前駆体は、固有な配列において充分過剰な量でかつ完全な反応を確認するのに充分な時間で添加される。ヌクレオチド前駆体は、実施例において再現されるプログラムにおけるように1度にひとつずつ添加されることができ、また、3つまでのヌクレオチド前駆体が1度に添加されることもできる。

例えば、第3図に示される合成に関して、修飾されるべき部位において、正常に適合する塩基は「C」である。鋳型、プライマーおよびポリメラーゼの溶液に対して、dTTPおよびdATPの過剰な量が添加される。未反応の前駆体を流出した後、dCTPの過剰な量が第3番目の塩基までの合成を完了させるために添加される。dCTPが流出された後、dGTP、dATPおよびdTTPの過剰な量が、修飾される部位までの合成を行なうために添加される。

あるいはまた、不溶性の不活性支持体上に固定

されたDNA鋳型とプライマーを有するものであって、ポリメラーゼがヌクレオチド前駆体と共に反応器を通過し、かつ該ポリメラーゼは反応器の出口バルブより下の分子トラップにおいて保持されるシステムが用いられる。修飾されるヌクレオチドの前の鎖の位置の合成の間は、ポリメラーゼは該トラップを逆洗することによって循環される。しかしながら、その時点で、エラー傾向性ポリメラーゼ（すなわちニフトリ骨髄芽球腫ウィルスポリメラーゼのようなブルーフリーディング機能を有しないもの）が取込まれるヌクレオチド前駆体の1当量と共に用いられた。エラー傾向性ポリメラーゼが反応器から流出された後、配列合成は、適切なヌクレオチド前駆体および循環される高性能[high-fidelity]ポリメラーゼを用いて続けられる。

(4.5. 流出液中の取込まれなかったヌクレオチド前駆体の検知)

ヌクレオチドに関する、任意の定量的検定が流出液中の取込まれなかったヌクレオチドの検知に

より低いレベルで記録されるであろう（すなわち、吸光度の読みにおける、より低い増加があるだろう）。ヌクレオチド前駆体が成長する鎖中に取込まれなかった場合、添加されたすべてのヌクレオチドが流出液とともに洗い流され、そして流出液の吸光度は増加する。換言すれば、流出液の相対吸光度は、反応室へ添加された特定のヌクレオチド前駆体が鎖中へ取込まれたか否かを、そしてそれゆえヌクレオチド配列の次の塩基であるか否かを示すものである。本発明のこの実施態様の該段階の例が、第2図において図式的に示される。理想的に、伸長は、同時的様式において進行されるべきである。

本発明の一実施態様によると、流出液の吸光度は254nmの波長で計測され得る。それぞれのヌクレオチド前駆体は、固有な比吸収最大（すなわち最大吸収の波長）を有する。しかしながら、結果として、流出液の吸光度は、特定の反応からの流出液を測定した場合に、添加されたそれぞれのヌクレオチド前駆体に関する比波長吸収最大でリ

用いられ得る。流出液中の取込まれなかったヌクレオチドを検知するために用いられるいくつかの方法には、吸収もしくは蛍光分光のような分光学的な方法、放射性標識および計数（ヌクレオチド前駆体が放射標識されることを与える。）、ならびに電気化学的もしくは伝導率法が含まれるが、もちろんこれらに限定されるものではない。これらの方法のいくつかが以下により詳細に述べられる。

(4.5.1. 吸収分光学)

ヌクレオチドが紫外域における光を（例えば、254nmの波長または250～280nmの範囲で）吸収するゆえに、紫外域における流出液の吸光度は、反応室へ添加された特定のヌクレオチドが成長するヌクレオチド鎖中に取込まれたか否かを示すことができる。より詳しくは、流出液の吸光度は、成長するヌクレオチド鎖中へのヌクレオチド前駆体の取込みと逆相関する。すなわち、ヌクレオチド前駆体が成長するヌクレオチド鎖中に取込まれた場合、流出液中にはより少ないヌクレオチドが存在し、そして流出液の吸光度は相応する

セットされ得る。

本発明の他の実施態様において、流出液は、ヌクレオチドによって吸収される波長で励起される発光された蛍光物質で一側面を被覆された検出器セルを通過させられることができる。流出液中のヌクレオチドの存在は、これゆえ蛍光の消光により検知され得る。

(4.5.2. 標識された前駆体の検知)

ヌクレオチド前駆体は、 ^{32}P 、 ^3H もしくは ^{35}S （ β -エミッター）、または ^{131}I （ γ -エミッター）のような適当な放射性同位元素で標識されることができる。流出液は、任意の適当な検出器、好ましくはフローセルを備えた検出器を用いて、放射標識された前駆体の存在に関し検定され得る。例えば、ベータ活性の測定は、ガスイオン化法（例えば、ガイガー-ミュラー カウンター）またはシンチレーションカウンティングを用いた装置によって達せられ得る。同様にガンマ活性の測定は、市販に得られうるガンマカウンターによって検知され計数され得る。

(4.5.3. 電気化学的検知)

電気化学的検知は、酸化または還元反応を受けることのできる化学品の酸化、または還元を誘導する様式においてフローセルを横切る電位を適用することを含むものである。

(4.5.4. 伝導率検知)

伝導率検知は、適用された電位に対するフローセル中の溶液の抵抗を測定することを含むものである。溶質濃度における非常にわずかな変化が、溶液の抵抗において検知可能な変化をもたらす得る。

(4.6. オートメーションおよびコンピューターの使用)

理想的に、本発明の方法は、オートメーション化され得、また、前駆体の選択および添加を制御し、それぞれの添加されたヌクレオチドからの流出液に関して得られた吸光度の読みを記録すること、ならびにこのようにして得られた配列を印刷出力することをプログラムされたコンピューターによって規整され得る。このようなプログラムの

キューベーションの後、流出液のOD₂₅₄の読みの総和は、dGTPの0.07nmolが取込まれたことを示した。dGTPでの追加的なインキューベーションは、何らさらに取込みをもたらさなかった。過剰なdCTPとの反応および流出液のOD₂₅₄の読みの総和は、dCTPの0.16nmolの取込みを示した。反応容器中の溶液は次に回収され、そして約0.11nmolのDNAが存在することが測定された。

プライマー鎖は、1つのGによって、続いて2つのCによって伸長されたゆえに、鋳型鎖のプライマー配列後の、最初の3つのヌクレオチドの配列はCGGであることが推論された。

(6. 実施例：用いられたコンピュータープログラム)

以下の配列決定プログラムにおいて、「SEQ」プログラムは、配列決定実行のための基本的な、操作パラメーターを確立する。オペレーターは、オートマチック制御またはオペレーター制御の選択を最初に与えられる。オートマチック選択が選

フローチャートが第4図に示される。第4図において表わされる案によると、ヌクレオチドの首尾よい取込みは、第4.4節において述べられるような最後から二番目のヌクレオチド前駆体の添加へと続く。

最初の実施例は、高圧液体クロマトグラフィーポンプおよび紫外線検知器に接続された第5図に示される反応器の使用に関するものである。ポンプ、切換バルブおよび注入器は、第2の実施例において再現されるもののような、ベーシック言語で書かれたプログラムを実行するゆだねられたコンピューターによって制御され得る。

(5. 実施例：オリゴヌクレオチド配列の決定)

反応容器は、17-塩基プライマーとハイブリット形成されたM13-Mp10-DNAの200μlを、開口された装填孔を通じて、充填された。該容器は密封され、そしてOD₂₅₄の読みが安定化するまで緩衝液で洗浄された。取込みに関して試験された最初の塩基はdGTPであった。イン

べられた場合、次の決定は、ノイズ消去ルートが使用されるか否かであり、またそれが使用された場合、いくつの塩基が進行した後に行なうかである。オートマチック実行においては、回転バルブは最初に正しく位置されていることが本質的であり、それゆえ、助長する注意が、バルブセッティングをチェックするためにオペレーターに対してスクリーン上に出される。

付加的な操作パラメーターが、次に吟味され、そしてオペレーターによって変更され得る：(1) 洗浄流速、(2) 装填流速、(3) 反応流速(通常は0)、(4) 反応器への移動時間、(5) 反応時間、(6) 塩基使用を決定するための閾値限界、(7) 全実行時間。これらの値は、所望される場合、ハードコピーで印刷され得る。該プログラムは次にプログラム「W」へエグジットされる。「W」プログラムは、配列を決定されたように蓄積するためにデータファイルを開設する一方、系を洗浄することを開始する。「W」は次に、注入すること、インキューベートすること、および

d A T P の取り上げを評価することに関して、応答し得る「L A T」プログラムを呼び出す。「L A T」は最初に、流れを装填流速へ低減し、そして注入器を装填にセットする。次に d A T P 装填に回転バルブがセットされる。分析ファイル「A」が、次に、実行を制御すること、およびデータを得ること援助するために呼び出される。最初に d A T P のアリコート ([aliquot], 部分標本) が注入され、「S E Q」において設定された時間の間インキュベートされる反応器へ移動する。同時に回転バルブは、洗浄にセットされる。インキュベーションの後、反応容器はモニター中へ洗浄され、そして吸収ピーク積分および評価が始まる。この実行の結果はスクリーン上に表示される。取込みが起こった場合、この塩基はデータファイル中へ入力され、一方取込みが起らなかった場合には、試験される次の塩基が決められる。首尾よい塩基取込みが今だ起こっていない場合、塩基は A、C、G および T の順序で単純に試される。以前の取込みがあった場合には、試される次の塩

基は取込まれた最後から二番目のものである。これは、不完全に停止した鎖に対して、今首尾よく取込まれた塩基の一段階後ろに進ませることをもたらす。「S E Q」プログラムにおいて決められたように、これらの不完全鎖は、最後から二番目の取込まれた塩基を試した後に、最後に取込まれた塩基を繰返すことによって局面へと進められ得る。

変異生成プログラムは、配列決定手順と同様な様式において、成長するヌクレオチド鎖へのヌクレオチド前駆体の連続的な添加を制御する。しかしながら、取込みによって決定される塩基添加の配列に代わり、塩基の添加は、ユーザーによって入力された配列によって規整される。プログラムは、変異生成のための位置までの固有の塩基を連続的に添加し、その位置において、変異生成する塩基が添加される。その取込みの後、すべての塩基が添加されそして複製が完了へと進行する。

(6 . 1 . 配列決定プログラム)

```
BASIC: SEQ
1 PRINT "COPYRIGHT 1985 DR.ROBERT J.MELAMÉDE"
2 FOR Y=1TO100
3 NEXT Y
5 PRINT #P,"COPYRIGHT 1985 DR.ROBERT J.MELAMÉDE"
10 CLEAR
12 A=0
13 Z=0
14 QS="0"
15 PS="0"
16 TS="0"
17 INPUT "IS THIS A MANUAL INJECT TEST RUN"TS
18 IF TS="Y" GOTO 30
19 INPUT "DO YOU WISH TO ACTIVATE NOISE ELIMINATION PROCESS"NS
20 IF NS="Y" INPUT "HOW MANY BASES BEFORE NOISE ELIMINATION"N1
```

```
30 PRINT "DATP=#1 DCTP=#2 DGTP=#3 DTTP=#4
WASH=#6 (85)"
40 PRINT "DO YOU WISH TO STEP THE VALVE?"
50 INPUT SS
60 IF SS="N" THEN GOTO 145
70 IF SS="Y" THEN 80
80 XCOM 10FF
90 XCOM 20N
100 FOR Y=1TO100
110 NEXT Y
120 XCOM 20FF
130 XCOM 10N
140 GOTO 40
145 CLEAR
150 PRINT "TO CHANGE THE DEFAULT VALUES ( )
OF CONTROL VARIABLES"
160 PRINT "ENTER Y FOLLOWED BY RETURN"
165 PRINT
170 INPUT "DO YOU WANT TO CHANGE THE WASH
```

```

      FLOWRATE (.5)"Y$
180 IF Y$="Y" THEN GOTO 200
190 IF Y$="N" GOTO 220
200 INPUT "ENTER THE NEW WASH FLOWRATE"W
210 GOTO 230
220 W=.5
230 INPUT "DO YOU WANT TO CHANGE THE LOAD
      FLOWRATE (.2)"Y$
240 IF Y$="Y" THEN GOTO 260
250 IF Y$="N" THEN GOTO 280
260 INPUT "ENTER THE NEW LOAD FLOWRATE"L
265 GOSUB 3000
269 CLEAR
270 GOTO 290
280 L=.2
290 INPUT"DO YOU WANT TO CHANGE THE REACTION
      FLOWRATE (0)"Y$
300 IF Y$="Y" THEN GOTO 320
310 IF Y$="N" THEN GOTO 340
320 INPUT "ENTER NEW REACTION FLOWRATE"R

```

```

      THRESHOLD LIMITS?"
482 A(1)=20000
483 A(2)=20000
484 A(3)=20000
485 A(4)=20000
486 PRINT "ADENINE="A(1);
487 PRINT "CYTOSINE="A(2);
488 PRINT "GUANINE="A(3);
489 PRINT "THYMINE="A(4);
490 INPUT Y$
495 IF Y$="Y" THEN GOTO 510
500 IF Y$="N" THEN 530
510 PRINT "ENTER THE NEW AREA LIMIT FOR EACH
      BASE"
512 INPUT "ADENINE"A(1)
514 INPUT "CYTOSINE"A(2)
516 INPUT "GUANINE"A(3)
518 INPUT "THYMINE"A(4)
520 CLEAR
530 E1=3.5

```

```

330 GOTO 360
340 R=0
360 INPUT "DO YOU WANT TO CHANGE TRAVEL TIME
      TO REACTOR (.47)"Y$
370 IF Y$="Y" THEN GOTO 390
380 IF Y$="N" THEN GOTO 410
390 INPUT "ENTER NEW TRAVEL TIME"T
400 GOTO 415
410 T=.3
415 T=T+.1
420 INPUT"DO YOU WANT TO CHANGE THE REACTION
      TIME?(1.5)"Y$
430 IF Y$="Y" THEN 450
440 IF Y$="N" THEN 470
450 INPUT "ENTER NEW REACTION TIME"I
455 I=I+T
460 GOTO 480
470 I=1.5+T
475 CLEAR
480 PRINT "DO YOU WANT TO CHANGE THE AREA

535 PRINT "DO YOU WANT TO CHANGE THE RUN
      TIME";E1
537 INPUT Y$
539 IF Y$="N" THEN 550
540 INPUT "ENTER NEW RUN TIME VALUE"E1
541 PRINT
542 PRINT "THIS VALUE WILL AUTOMATICALLY BE
      ENTERED INTO"
544 PRINT "ALL OF THE ANALYSIS AND INTEGRATI
      ON FILES"
545 PRINT
550 GOSUB 2000
600 CLEAR
605 PRINT
610 INPUT "DO YOU WANT A PRINTOUT OF THE
      OPERATION PARAMETERS?"Y$
620 IF Y$="Y" THEN GOTO 640
630 IF Y$="N" THEN GOTO 710
640 PRINT #P,"LOAD FLOWRATE";L
650 PRINT #P,"WASH FLOWRATE";W

```

```

660 PRINT #P,"REACTION FLOWRATE";P
670 PRINT #P,"TRAVEL TIME";T-.1
680 PRINT #P,"REACTION TIME";I-T
690 PRINT #P,"AREA THRESHOLD VALUES A/C/G/T"
    A(1);A(2);A(3);A(4)
700 PRINT #P,"RUN TIME";E1
710 INPUT "DO YOU WANT TO START?"YS
720 IF YS="N" THEN GOTO 710
730 CHAIN"W"
2000 PRINT #K,"LIST";"A";"A"
2010 PRINT #K,"V"
2020 FOR Y=1TO5
2030 PRINT #K,CHR$(9);
2040 NEXT Y
2050 PRINT #K,E1
2060 PRINT #K,CHR$(27);
2100 PRINT #K,"LIST";"A";"B"
2110 PRINT #K,"V"
2120 FOR Y=1TO5
2130 PRINT #K,CHR$(9);

2430 PRINT #K,CHR$(9);
2440 NEXT Y
2450 PRINT #K,I+.1
2470 PRINT #K,CHR$(9);
2480 PRINT #K,E1
2490 PRINT #K,CHR$(27);
2500 PRINT #K,"LIST";"I";"B"
2510 PRINT #K,"V"
2520 FOR Y=1TO12
2530 PRINT #K,CHR$(9);
2540 NEXT Y
2550 PRINT #K,E1
2560 PRINT #K,CHR$(27);
2600 PRINT #K,"LIST";"I";"C"
2610 PRINT #K,"V"
2620 FOR Y=1TO12
2630 PRINT #K,CHR$(9);
2640 NEXT Y
2650 PRINT #K,E1
2660 PRINT #K,CHR$(27);

2140 NEXT Y
2150 PRINT #K,E1
2160 PRINT #K,CHR$(27);
2200 PRINT #K,"LIST";"A";"C"
2210 PRINT #K,"V"
2220 FOR Y=1TO5
2230 PRINT #K,CHR$(9);
2240 NEXT Y
2250 PRINT #K,E1
2260 PRINT #K,CHR$(27);
2300 PRINT #K,"LIST";"A";"D"
2310 PRINT #K,"V"
2320 FOR Y=1TO5
2330 PRINT #K,CHR$(9);
2340 NEXT Y
2350 PRINT #K,E1
2360 PRINT #K,CHR$(27);
2400 PRINT #K,"LIST";"I";"A"
2410 PRINT #K,"V"
2420 FOR Y=1TO11

2700 PRINT #K,"LIST";"I";"D"
2710 PRINT #K,"V"
2720 FOR Y=1TO12
2730 PRINT #K,CHR$(9);
2740 NEXT Y
2750 PRINT #K,E1
2760 PRINT #K,CHR$(27);
2800 RETURN
3000 PRINT #K,"LIST";"A";"A"
3010 PRINT #K,"V"
3020 FOR Y=1TO3
3030 PRINT #K,CHR$(9);
3040 NEXT Y
3050 PRINT #K,L
3060 PRINT #K,CHR$(27);
3100 PRINT #K,"LIST";"A";"B"
3110 PRINT #K,"V"
3120 FOR Y=1TO3
3130 PRINT #K,CHR$(9);
3140 NEXT Y

```

```

3150 PRINT #K,L
3160 PRINT #K,CHR$(27);
3200 PRINT #K,"LIST";"A";"C"
3210 PRINT #K,"V"
3220 FOR Y=1TO3
3230 PRINT #K,CHR$(9);
3240 NEXT Y
3250 PRINT #K,L
3260 PRINT #K,CHR$(27);
3300 PRINT #K,"LIST";"A";"D"
3310 PRINT #K,"V"
3320 FOR Y=1TO3
3330 PRINT #K,CHR$(9);
3340 NEXT Y
3350 PRINT #K,L
3360 PRINT #K,CHR$(27);
3400 RETURN

BASIC:W
1 COPYRIGHT 1985 DR.ROBERT J.MELAMEDE

15 FOR Y=1TO100
20 NEXT Y
25 REM SET ROTORY VALVE TO LOAD DATP
30 XCOM 10FF,20N
40 FOR Y=1TO100
50 NEXT Y
60 XCOM 20FF,10N
100 FOR Y=1TO10000
110 NEXT Y
119 REM SET LOAD FLOW RATE
120 PRINT #K,"FLOW"L
125 FOR Y=1TO100
130 NEXT Y
140 PRINT #P,B$
150 FOR Y=1TO200
155 NEXT Y
195 REM CALL UP CCM SUBROUTINE FOR ANALYSIS
    RUN
200 PRINT #K,"ANALYSE";"A"
204 REM USE RELAY TO PUSH START BUTTON

```

```

5 CLEAR
10 PRINT #K,"FLOW"W
12 A$="SEQUENCE"
13 OPEN #D5,A$
14 PRINT #D5,"START"
15 CLOSE #D5
40 CHAIN "LAT"

BASIC: LAT
1 REM COPYRIGHT 1985 DR.ROBERT J.MELAMEDE"
2 PRINT #K,"FLOW"L
3 FOR Y=1TO500
4 NEXT Y
5 REM RESET INJECTOR TO LOAD
6 XCOM 30FF,40N
7 FOR Y=1TO100
8 NEXT Y
11 IF TS="Y"INPUT"ENTER BASE IDENTIFICATION
    WHEN LOADED"B$
13 IF TS="Y" GOTO 120

205 PRINT #K,CHR$(7)
210 FOR Y=1TO100
211 NEXT Y
212 IF ELT(0)<.1 THEN 212
214 REM INJECT DATP
215 XCOM 40FF,30N
216 REM SET REACTION TIME AND FLOWRATE
217 IF ELT(0)<T THEN 217
218 PRINT #K,"FLOW"R
220 IF ELT(0)<1 THEN 220
221 IF TS="Y" GOTO 240
222 FOR X=1TO5
223 XCOM 10FF,20N
224 FOR X=1TO100
225 NEXT Y
226 XCOM 20FF,10N
227 FOR Y=1TO100
228 NEXT Y
229 NEXT X
230 REM LINES 222 TO 229 RESET ROTORY VALVE

```

```

      TO WASH
240 IF ELT(0)<1 THEN 240
245 REM WASH REACTOR FOR EVALUATION OF RUN
250 PRINT #K,"FLOW"W
260 IF ELT(0)<E1 THEN 260
262 FOR Y=1TO500
263 NEXT Y
265 IF T$="Y"CHAIN"W"
269 REM READ DATA FILE FROM RUN
270 A$="AP"
279 C1=0
280 OPEN #D1,A$
290 INPUT #D1,295,K,B,C
292 C1=C+C1
294 GOTO 290
295 CLOSE #D1
297 REM DISPLAY RESULTS ON SREEN
298 IF Z=0 THEN Z=1
300 PRINT Z;
301 Z=Z+1

```

```

395 IF Z1<N1 GOTO 400
396 Z1=0
397 Q$=P$
400 IF Q$="C" THEN 402
401 GOTO 410
402 Q$=0
403 CHAIN "LBT"
410 IF Q$="G" THEN 412
411 GOTO 420
412 Q$=0
413 CHAIN "LCT"
420 IF Q$="I" THEN 422
421 GOTO 430
422 Q$=0
423 CHAIN "LOT"
430 IF Q$="O" THEN 431
431 CHAIN "LBT"

```

BASIC: LBT

1 REM COPYRIGHT 1985 DR. ROBERT J. HELAHEDE

```

302 PRINT C1;
303 PRINT "A";
304 PRINT "/";
310 IF C1>A(1) THEN 395
311 REM SAVES LAST RESULT AS Q$
312 Q$=P$
314 REM REDEFINES P$WITH LATEST RESULTS
315 P$="A"
319 REM SAVES SUCCESSFUL RUNS IN SEQUENCE
      DATA FILE
320 S$="SEQUENCE"
330 OPEN #D5,S$
340 PRINT #D5,"A"
350 CLOSE #D5
354 REM COUNTER FOR NOISE ELIMINATING ROUTIN
      E
355 Z1=Z1+1
390 CHAIN "LAT"
394 REM RESETS NOISE COUNTER AND ELIMINATES
      CARRIED NOISE

```

```

5 PRINT #K,"FLOW"W
10 XCOM 30FF,40N
15 FOR Y=1TO100
16 NEXT Y
19 REM SETS ROTARY VALVE TO LOAD DCTP
20 FOR X=1TO2
30 XCOM 10FF,20N
40 FOR Y=1TO100
50 NEXT Y
60 XCOM 20FF,10N
70 FOR Y=1TO100
80 NEXT Y
90 NEXT X
100 FOR Y=1TO10000
110 NEXT Y
200 PRINT #K,"ANALYSE";"B"
205 PRINT #K,CHR$(7)
210 FOR Y=1TO100
211 NEXT Y
212 IF ELT(0)<.1 THEN 212

```

```

215 XCOM 40FF,30N
217 IF ELT(0)<T THEN 217
218 PRINT #K,"FLOW"R
222 FOR X=1T04
223 XCOM 10FF,20N
224 FOR X=1T0100
225 NEXT Y
226 XCOM 20FF,10N
227 FOR Y=1T0100
228 NEXT Y
229 NEXT X
240 IF ELT(0)<I THEN 240
250 PRINT #K,"FLOW"R
260 IF ELT(0)<E1 THEN 260
270 B$="BP"
279 C2=0
280 OPEN #D2,B$
290 INPUT #D2,295,K,B,C
292 C2=C+C2
293 GOTO 290

```

```

401 GOTO 410
402 Q$=0
403 CHAIN "LAT"
410 IF Q$="G" THEN 412
411 GOTO 420
412 Q$=0
413 CHAIN "LCT"
420 IF Q$="T" THEN 422
421 GOTO 430
422 Q$=0
423 CHAIN "LDT"
430 IF Q$="O" THEN 431
431 CHAIN "LCT"

```

BASIC: LCT

```

1 REM COPYRIGHT 1985 DR.ROBERT J.MELANEDE
5 PRINT #K,"FLOW"R
10 XCOM 30FF,40N
15 FOR Y=1T0100
16 NEXT Y

```

```

295 CLOSE #D2
298 IF Z=0 THEN Z=1
300 PRINT Z;
301 Z=Z+1
302 PRINT C2;
303 PRINT "C";
304 PRINT "/";
310 IF C2>A(2) THEN 395
312 Q$=P$
315 P$="C"
320 S$="SEQUENCE"
330 OPEN #D5,S$
340 PRINT #D5,"C"
350 CLOSE #D5
355 Z1=Z1+1
390 CHAIN "LBT"
395 IF Z1<N1 GOTO 400
396 Z1=0
397 Q$=P$
400 IF Q$="A" THEN 402

```

```

19 REM SET ROTARY VALVE TO LOAD DGTP
20 FOR Y=1T03
30 XCOM 10FF,20N
40 FOR Y=1T0100
50 NEXT Y
60 XCOM 20FF,10N
70 FOR Y=1T0100
80 NEXT Y
90 NEXT X
100 FOR Y=1T010000
110 NEXT Y
200 PRINT #K,"ANALYSE";"C"
205 PRINT #K,CHR$(7)
210 FOR Y=1T0100
211 NEXT Y
212 IF ELT(0)<.1 THEN 212
215 XCOM 40FF,30N
217 IF ELT(0)<T THEN 217
218 PRINT #K,"FLOW"R
220 IF ELT(0)<1 THEN 220

```

```

222 FOR X=1T03
223 XCOM 10FF,20N
224 FOR X=1T0100
225 NEXT Y
226 XCOM 20FF,10N
227 FOR Y=1T0100
228 NEXT Y
229 NEXT X
240 IF ELT(0)<I THEN 240
250 PRINT #K,"FLOW"W
260 IF ELT(0)<E1 THEN 260
270 C$="CP"
279 C3=0
280 OPEN #D3,C$
290 INPUT #D3,295,K,B,C
292 C3=C+C3
293 GOTO 290
295 CLOSE #D3
298 IF Z=0 THEN Z=1
300 PRINT Z;

```

```

410 IF Q$="C" THEN 412
411 GOTO 420
412 Q$=0
413 CHAIN "LBT"
420 IF Q$="I" THEN 421
421 Q$=0
422 CHAIN "LDT"
430 IF Q$="O" THEN 431
431 CHAIN "LDT"

```

BASIC: LDT

```

1 REM COPYRIGHT 1985 DR.ROBERT J.MELANEDE
5 PRINT #K,"FLOW"W
10 XCOM 30FF,40N
12 FOR Y=1T0100
13 NEXT Y
19 REM SET ROTORY VALVE TO LOAD DTP
20 FOR Y=1T04
30 XCOM 10FF,20N
40 FOR Y=1T0100

```

```

301 Z=Z+1
302 PRINT C3;
303 PRINT "G";
304 PRINT "/";
310 IF C3>A(3) THEN 395
312 Q$=P$
315 P$="G"
320 S$="SEQUENCE"
330 OPEN #D5,S$
340 PRINT #D5,"G"
350 CLOSE #D5
355 Z1=Z1+1
390 CHAIN "LCT"
395 IF Z1<N1 GOTO 400
396 Z1=0
397 Q$=P$
400 IF Q$="A" THEN 402
401 GOTO 410
402 Q$=0
403 CHAIN "LAT"

50 NEXT Y
60 XCOM 20FF,10N
70 FOR Y=1T0100
80 NEXT Y
90 NEXT X
100 FOR Y=1T010000
110 NEXT Y
200 PRINT #K,"ANALYSE";"D"
205 PRINT #K,CHR$(7)
210 FOR Y=1T0100
211 NEXT Y
212 IF ELT(0)<.1 THEN 212
215 XCOM 40FF,30N
217 IF ELT(0)<T THEN 217
218 PRINT #K,"FLOW"R
220 IF ELT(0)<1 THEN 220
222 FOR X=1T02
223 XCOM 10FF,20N
224 FOR X=1T0100
225 NEXT Y

```

```

226 XCOM 20FF,10N
227 FOR Y=1TO100
228 NEXT Y
229 NEXT X
240 IF ELT(0)<I THEN 240
250 PRINT #K,"FLOW"
260 IF ELT(0)<E1 THEN 260
270 D$="DP"
279 C4=0
280 OPEN #D4,D$
290 INPUT #D4,295,K,B,C
292 C4=C+C4
293 GOTO 290
295 CLOSE #D4
298 IF Z=0 THEN Z=1
300 PRINT Z;
301 Z=Z+1
302 PRINT C4;
303 PRINT "T";
304 PRINT "/";

```

```

420 IF Q$="G" THEN 422
421 GOTO 430
422 Q$=0
423 CHAIN "LCT"
430 IF Q$="0" THEN 431
431 CHAIN "LAT"

```

(6 . 2 . 部位特異的変異生成プログラム)

```

BASIC: MUT
1 PRINT"COPYRIGHT 1985 DR.ROBERT J.HELAMEDE"
2 FOR Y=1TO100
3 NEXT Y
4 PRINT #P,"COPYRIGHT 1985 DR.ROBERT J.HELAMEDE"
5 CLEAR
7 GOTO 5000
9 CLEAR
10 PRINT "TO USE THIS SITE SPECIFIC MUTAGENIC
    SIS PROCEDURE"

```

```

310 IF C4>A(4) THEN 395
312 Q$=P$
315 P$="T"
320 S$="SEQUENCE"
330 OPEN #D4,S$
340 PRINT #D4,"T"
350 CLOSE #D4
355 Z1=Z1+1
390 CHAIN "LDT"
395 IF Z1<N1 GOTO 400
396 Z1=0
397 Q$=P$
400 IF Q$="A" THEN 402
401 GOTO 410
402 Q$=0
403 CHAIN "LAT"
410 IF Q$="C" THEN 412
411 GOTO 420
412 Q$=0
413 CHAIN "LBT"

```

```

20 PRINT "YOU MUST FIRST ENTER THE DNA SEQUE
    NCE FROM THE"
30 PRINT "PRIMER UP TO BUT NOT INCLUDING THE
    BASE YOU WISH TO"
40 PRINT "                CHANGE"
50 PRINT
110 DIM A(100)
115 INPUT"HOW MANY BASES TILL THE MUTATION"N
118 PRINT"ENTER SEQUENCE AS A C G T FOLLOWED
    BY RETURN"
120 FOR I=1 TO N
125 PRINT I;
130 INPUT S$
140 IF S$="A" THEN A(I)=1
160 IF S$="C" THEN A(I)=2
180 IF S$="G" THEN A(I)=3
200 IF S$="T" THEN A(I)=4
215 NEXT I
219 CLEAR
220 FOR J=1 TO N

```



```

225 PRINT I;
230 IF A(I)=1 THEN PRINT"A ";
250 IF A(I)=2 THEN PRINT"C ";
255 IF A(I)=3 THEN PRINT"G ";
260 IF A(I)=4 THEN PRINT"T ";
310 NEXT Y
315 PRINT
320 INPUT "ENTER Y FOLLOWED BY RETURN TO
      START"Y$
330 IF Y$="Y" THEN 340
340 PRINT
360 FOR I=1TO N
370 IF A(I)=1 THEN 390
380 GOTO 700
390 XCOM 3OFF,40N
400 FOR Y=1TO500
410 NEXT Y
415 XCOM 10FF,20N
420 FOR Y=1TO100
430 NEXT Y

670 NEXT I
680 GOTO 370
700 IF A(I)=2 THEN GOTO 720
710 GOTO 1100
720 XCOM 3OFF,40N
730 FOR Y=1TO500
740 NEXT Y
750 FOR X=1TO2
760 XCOM 10FF,20N
770 FOR Y=1TO100
780 NEXT Y
790 XCOM 20FF,10N
800 FOR Y=1TO100
810 NEXT Y
820 NEXT X
830 XCOM 40FF,30N
840 FOR Y=1TO500
850 NEXT Y
860 FOR Y=1TO4
870 XCOM 10FF,20N

440 XCOM 20FF,10N
450 FOR Y=1TO100
460 NEXT Y
470 XCOM 40FF,30N
480 FOR Y=1TO500
490 NEXT Y
560 FOR Y=1TO5
570 XCOM 10FF,20N
580 FOR Y=1TO100
590 NEXT Y
600 NEXT X
610 PRINT #K,"FLOW"F
620 IF ELT(0)<T THEN 620
630 PRINT #K,"FLOW"O
640 IF ELT(0)<R THEN 640
650 PRINT #K,"FLOW"F
660 IF ELT(0)<W THEN 660
665 PRINT I;
666 PRINT "A ";
667 IF I=N THEN 2000

880 FOR Y=1TO100
890 NEXT Y
900 XCOM 20FF,10N
910 FOR Y=1TO100
920 NEXT Y
930 NEXT X
940 PRINT #K,"FLOW"F
950 IF ELT(0)<T THEN 950
960 PRINT #K,"FLOW"O
970 IF ELT(0)<R THEN 970
980 PRINT #K,"FLOW"F
990 IF ELT(0)<W THEN 990
995 PRINT I;
996 PRINT "C ";
997 IF I=N THEN 2000
1000 NEXT I
1010 GOTO 370
1100 IF A(I)=3 THEN GOTO 1120
1120 XCOM 30FF,40N
1125 FOR Y=1TO500

```

```

1130 NEXT Y
1140 FOR X=1T03
1150 XCOM 10FF,20N
1160 FOR Y=1T0100
1170 NEXT Y
1180 XCOM 20FF,10N
1190 FOR Y=1T0100
1200 NEXT Y
1210 NEXT X
1220 XCOM 40FF,30N
1230 FOR Y=1T0500
1240 NEXT Y
1250 FOR Y=1T03
1260 XCOM 10FF,20N
1270 FOR Y=1T0100
1280 NEXT Y
1290 XCOM 20FF,10N
1300 FOR Y=1T0100
1310 NEXT Y
1320 NEXT X

```

```

1590 XCOM 20FF,10N
1600 FOR Y=1T0100
1610 NEXT Y
1620 NEXT X
1630 XCOM 40FF,30N
1640 FOR Y=1T0500
1650 NEXT Y
1660 FOR Y=1T02
1670 XCOM 10FF,20N
1680 FOR Y=1T0100
1690 NEXT Y
1700 XCOM 20FF,10N
1710 FOR Y=1T0100
1720 NEXT Y
1730 NEXT X
1740 PRINT #K,"FLOW"F
1750 IF ELT(0)<T THEN 1750
1760 PRINT #K,"FLOW"0
1770 IF ELT(0)<R THEN 1770
1780 PRINT #K,"FLOW"F

```

```

1330 PRINT #K,"FLOW"F
1340 IF ELT(0)<T THEN 1340
1350 PRINT #K,"FLOW"0
1360 IF ELT(0)<R THEN 1360
1370 PRINT #K,"FLOW"F
1380 IF ELT(0)<W THEN 1380
1385 PRINT I;
1386 PRINT "G ";
1387 IF I=N THEN 2000
1390 NEXT I
1400 GOTO 370
1500 IF A(I)=4 THEN GOTO 1520
1510 GOTO 370
1520 XCOM 30FF,40N
1530 FOR Y=1T0500
1540 NEXT Y
1550 FOR Y=1T04
1560 XCOM 10FF,20N
1570 FOR Y=1T0100
1580 NEXT Y

```

```

1790 IF ELT(0)<W THEN 1790
1795 PRINT I;
1796 PRINT "T ";
1797 IF I=N THEN 2000
1800 NEXT I
1810 GOTO 370
2000 PRINT "SYNTHESIS IS NOW STOPPED JUST
      BEFORE BASE TO BE"
2010 PRINT "          MUTATED"
2020 PRINT
2030 PRINT "INPUT G ON THE ROTARY VALVE MUST
      CONTAIN THE"
2040 PRINT "ALTERED BASE AND THE BASE THAT
      FOLLOWS IT IN"
2050 PRINT "          THE SEQUENCE"
2060 PRINT "AFTER THIS REACTION IS COMPLETED
      INPUT G MUST"
2070 PRINT "          CONTAIN THE COMPLETE SET
      OF BASES"
2100 INPUT "ENTER Y FOLLOED BY RETURN WHEN

```

```

READY"Y$
2110 IF Y$="Y" THEN 2120
2120 XCOM 30FF,40N
2130 FOR Y=1T0500
2140 NEXT Y
2150 FOR X=1T05
2160 XCOM 10FF,20N
2170 FOR Y=1T0100
2180 NEXT Y
2190 XCOM 20FF,10N
2200 FOR Y=1T0100
2210 NEXT Y
2220 NEXT X
2230 XCOM 40FF,30N
2240 FOR Y=1T0500
2250 NEXT Y
2260 XCOM 10FF,20N
2270 FOR Y=1T0100
2280 NEXT Y
2290 PRINT #K,"FLOW"F

2510 XCOM 20FF,10N
2520 FOR Y=1T0100
2530 NEXT Y
2540 NEXT X
2550 XCOM 40FF,30N
2560 FOR Y=1T0500
2570 NEXT Y
2580 XCOM 10FF,20N
2590 FOR Y=1T0100
2600 NEXT Y
2610 XCOM 20FF,10N
2620 FOR Y=1T0100
2630 NEXT Y
2640 PRINT #K,"FLOW"F
2650 IF ELT(0)<T THEN 2650
2660 PRINT #K,"FLOW"O
2670 IF ELT(0)<F THEN 2670
2680 PRINT #K,"FLOW"F
2690 PRINT "          FINISHED"
2700 END

2300 IF ELT(0)<T THEN 2300
2310 PRINT #K,"FLOW"O
2320 IF ELT(0)<H THEN 2320
2330 PRINT #K,"FLOW"F
2340 IF ELT(0)<W THEN 2340
2390 PRINT
2400 PRINT "MUTATIONAL INSERTION IS COMPLETE
        INPUT 6 MUST"
2410 PRINT "          HAVE THE COMPLETE SET OF
        BASES"
2420 INPUT "ENTER Y WHEN READY TO RESUME
        SYNTHESIS"Y$
2430 IF Y$="Y" THEN 2440
2440 XCOM 30FF,40N
2450 FOR Y=1T0500
2460 NEXT Y
2470 FOR Y=1T05
2480 XCOM 10FF,20N
2490 FOR Y=1T0100
2500 NEXT Y

5000 PRINT "BELOW ARE THE VARIOUS OPERATIONA
        L PARAMETERS"
5001 PRINT "FLOWRATE=2"
5002 PRINT "TRAVEL TIME=.1"
5003 PRINT "REACTION TIME=2"
5004 PRINT "WASH TIME=1"
5005 PRINT "MUTATIONAL REACTION TIME=2"
5006 PRINT "COMPLETION REACTION=10"
5010 INPUT "IF YOU WANT TO CHANGE ANY OF
        THEM ENTER Y"Y$
5020 IF Y$="Y" THEN 5035
5030 GOTO 9
5035 CLEAR
5040 PRINT "TO CHANGE DEFAULT VALUES ENTER Y
        & RETURN"
5050 INPUT "DO YOU WANT TO CHANGE THE FLOW
        RATE (2)"Y$
5055 F=2
5056 T=.1
5060 IF Y$="Y" THEN 5080

```

```

5070 GOTO 5140
5080 INPUT "ENTER NEW FLOWRATE" F
5090 PRINT "THE PRODUCT OF FLOWRATE*TRAVEL
      TIME MUST EQUAL"
5100 PRINT "THE REQUIRED LOADING VOLUME THIS
      WILL AUTOMATICALLY"
5110 PRINT "          ALTERED"
5120 T=.2/F
5121 PRINT "THE NEW TRAVEL TIME VALUE IS";
      PRINT T
5140 INPUT "DO YOU WANT TO CHANGE REACTION
      TIME (2)" Y$
5145 R=2
5150 IF Y$="Y" THEN 5170
5160 GOTO 5180
5170 INPUT "ENTER THE NEW REACTION TIME
      VALUE" R
5180 INPUT "DO YOU WANT TO CHANGE THE WASH
      TIME (1)" Y$
5190 W=2

```

```

5410 PRINT #P, "TRAVEL TIME"; T
5420 PRINT #P, "REACTION TIME"; R
5430 PRINT #P, "WASH TIME"; W
5440 PRINT #P, "MUTATIONAL REACTION TIME" H
5450 PRINT #P, "COMPLETION REACTION TIME" F
5460 GOTO 9

```

```

5200 IF Y$="Y" THEN 5220
5210 GOTO 5230
5220 INPUT "ENTER THE NEW WASH TIME VALUE" W
5230 PRINT "DO YOU WANT TO CHANGE THE MUTATI
      ONAL REACTION TIME"
5240 INPUT "          (2)" Y$
5250 H=2
5260 IF Y$="Y" THEN 5280
5270 GOTO 5290
5280 INPUT "ENTER NEW MUTATIONAL REACTION
      TIME" H
5290 PRINT "DO YOU WANT TO CHANGE THE COMPLE
      TION REACTION"
5300 INPUT "          TIME(10)" Y$
5310 F=10
5320 IF Y$="Y" THEN 5340
5330 GOTO 5400
5340 INPUT "ENTER NEW REACTION COMPLETION
      TIME" F
5400 PRINT #P, "FLOW"; F

```

4. 図面の簡単な説明

第1図は、本発明の一実施態様の実施において用いられ得る異なる構成要素の概略図であり、第2図は、本発明による配列決定に用いられ得る反応および配列段階の概略表示であり、第3図は、本発明による部位特異的変異生成に用いられ得る反応および配列段階の概略表示であり、第4図は、本発明により用いられ得るコンピュータプログラムのフローチャートであり、また第5図は、本発明の一実施例において用いられた反応室の図である。

特許出願人 ニューヨーク メディカル カレッジ

代理人 弁理士 八 田 幹 雄

弁理士 小 塚 登 高

弁理士 村 瀬 一 英

図2の内容(内容に変更なし)

FIG. 1

構成要素の概略図

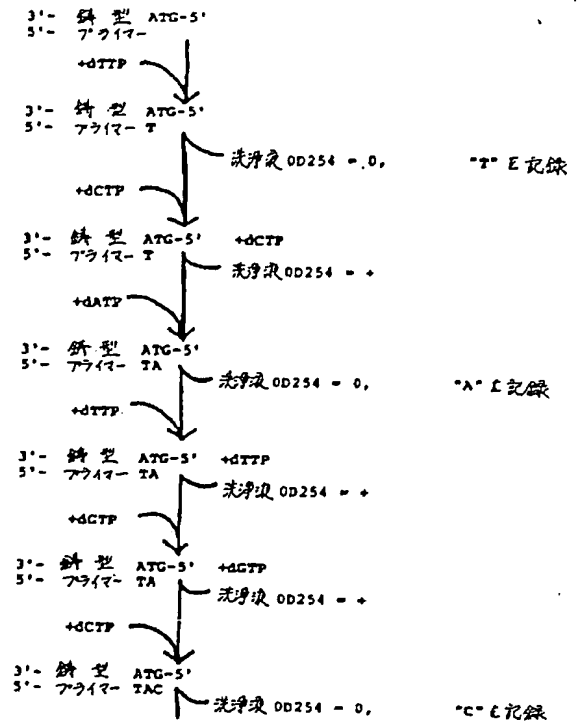
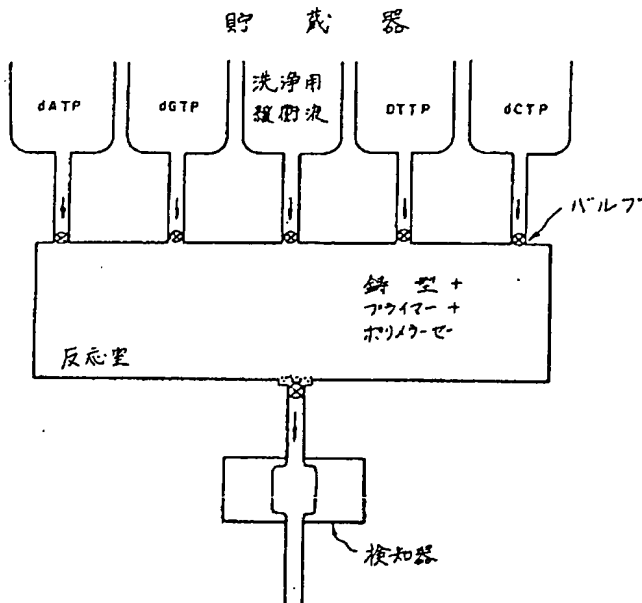


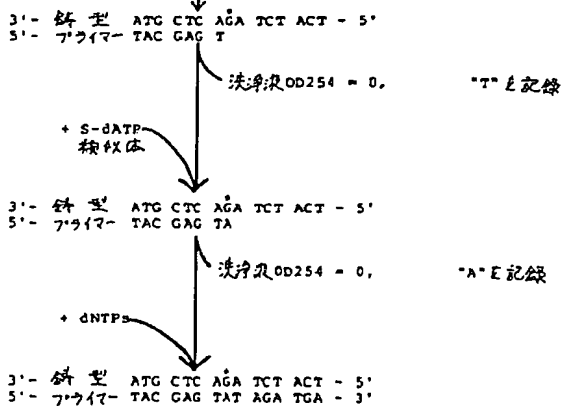
FIG 4

コンピュータ・プログラム
フローチャート

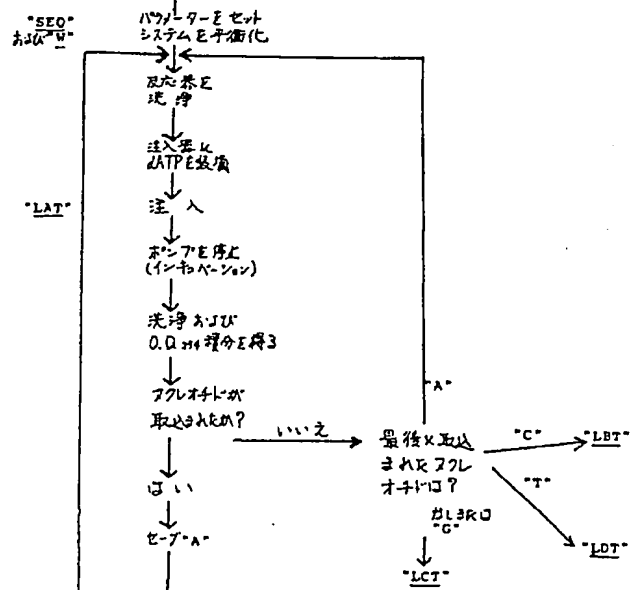
FIG 3

部位特異的変異生成

段階的合成



・ 所望の変異的塩基置換の部位



['LBT', 'LCT' および 'LDT' は、それぞれ dCTP, dGTP および dTTP に関する, 'LAT' と同一機能のサブプログラムである。]

昭和61年10月28日

特許庁長官 泉 田 明 雄 殿


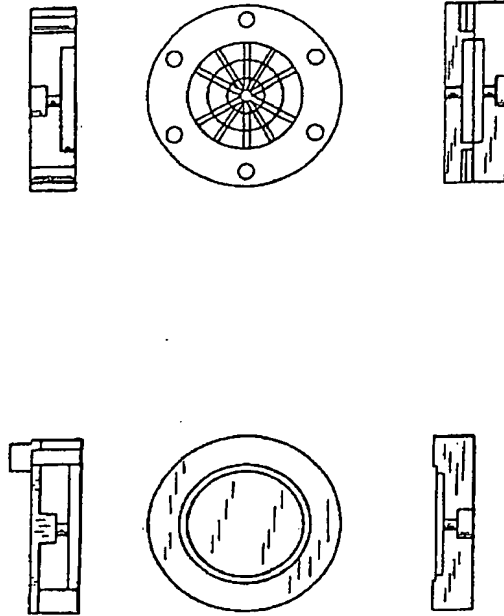
1. 事件の表示
昭和61年 特許願 第168,200号
2. 発明の名称
ヌクレオチド配列決定のためのオートメーション可能な方法
3. 補正をする者
事件との関係 特許出願人
住 所 アメリカ合衆国 ニューヨーク州 10595、
バルホーラ、エルムウッド ホール(番地なし)
名 称 ニューヨーク メディカル カレッジ
代表者 ハッシュ ジェイ、レイリー
国 籍 アメリカ合衆国
4. 代理人
住 所 東京都千代田区二番町11番地9 ダイアバレンス二番町
氏 名 (7234) 弁理士 八 田 幹 雄
電話 03-230-4766 務

5. 補正命令の日付
昭和61年9月3日(発送日:昭和61年9月30日)



FIG. 5

反転室の図



6. 補正の対象
 - (1) 明細書の全文
 - (2) 図 面
 - (3) 願書の「出願人」の欄
 - (4) 「委任状」およびその訳文
 - (5) 「法人国籍証明書」およびその訳文
7. 補正の内容
 - (1) 願書に最初に添付した明細書、図面の浄書・別紙のとおり
(内容に変更なし)
 - (2) 別紙添付の願書のとおり
 - (3) 別紙の委任状およびその訳文のとおり
 - (4) 別紙の委任状およびその訳文のとおり
法人国籍証明書